

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/70, C07K 16/28, 16/40, 14/705, A61K 39/00		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/24490
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. September 1995 (14.09.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/00843		D-69121 Heidelberg (DE). RODE, Hans-Jürgen [DE/DE]; In der Siedlerruh 26a, D-69123 Heidelberg (DE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 7. März 1995 (07.03.95)		(74) Anwalt: DEUFEL, Paul; Müller-Boré & Partner, Isartorplatz 6, D-80331 München (DE).	
(30) Prioritätsdaten: P 44 07 538.3 7. März 1994 (07.03.94) DE		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Mit geänderten Ansprüchen und Erklärung.</i>	
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHIRRMACHER, Volker [DE/DE]; Unterer Fauler Pelz, D-69117 Heidelberg (DE). KHAZAE, Khashayarsha [GB/DE]; Hermann Löns Weg 85, D-69270 Sandhausen (DE). HAAS, Claudia [DE/DE]; Weststrasse 19, D-74193 Schwaigern (DE). MOLDENHAUER, Gerd [DE/DE]; Brückengasse 41, D-69120 Heidelberg (DE). LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von-Brienstrasse 10, D-69151 Neckargemünd (DE). DÜBEL, Stefan [DE/DE]; Quinckestrasse 24, D-69120 Heidelberg (DE). BREITLING, Frank [DE/DE]; Schloßberg 49, D-69117 Heidelberg (DE). KIPRIYANOV, Sergey [DE/DE]; Handschuhheimer Landstrasse 91, D-69121 Heidelberg (DE). GOTTER, Stefanie [DE/DE]; Max-Reger-Strasse 15,			
(54) Title: CELL SURFACE PROTEIN AND EFFECTOR CELL BONDING REAGENT			
(54) Bezeichnung: BINDUNGSREAGENS FÜR ZELL-OBERFLÄCHENPROTEIN UND EFFEKTORZELLE			
(57) Abstract			
The present invention relates to a bonding reagent characterized in that it comprises a first bonding component for a cell surface protein and a second bonding component for an effector cell molecule having a co-stimulatory effect. The invention further relates to a process for preparing the bonding reagent, and to a vaccine containing said bonding reagent.			
(57) Zusammenfassung			
Die vorliegende Erfindung betrifft ein Bindungsreagens, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es eine erste Bindungskomponente für ein Zell-Oberflächenprotein und eine zweite Bindungskomponente für ein kostimulatorisch wirkendes Moleköl einer Effektorzelle aufweist. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung des Bindungsreagens sowie eine das Bindungsreagens enthaltende Vakzine.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

5

Bindungsreagens für Zell-Oberflächenprotein und Effektorzelle

10

Die Erfindung betrifft ein Bindungsreagens, ein Verfahren zu seiner Herstellung und eine das Bindungsreagens enthaltende Vakzine.

15 Es ist bekannt, daß bei aktiver Immunisierung die verwendeten Zellen oftmals nur eine schwache oder gar keine Immunogenität zeigen. Dies findet sich insbesondere, wenn Tumorzellen verwendet werden.

20 Versuche wurden unternommen, die Immunogenität von Zellen zu steigern. Vielfach führten solche Versuche, wie bei der Verwendung von durch Newcastle Disease Virus (nachstehend mit NDV bezeichnet) erhaltenen Onkolytaten, nicht zu befriedigenden Ergebnissen.

25 Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Immunogenität von Zellen gesteigert werden kann.

30 Erfindungsgemäß wird dies durch Bereitstellung eines Bindungsreagens erreicht, das sich dadurch auszeichnet, daß es eine erste Bindungskomponente für ein Zell-Oberflächenprotein und eine zweite Bindungskomponente für ein kostimulatorisch wirkendes Molekül einer Effektorzelle aufweist.

Der Ausdruck "erste Bindungskomponente" umfaßt jegliche Verbindung, die einerseits an ein Zell-Oberflächenprotein und andererseits an eine zweite Bindungskom-

ponente binden kann. Die Bindung kann direkt oder indirekt sein. Vorzugsweise ist die Verbindung ein Antikörper oder ein eine Bindungsdomäne aufweisender Teil davon. Günstigerweise ist ein solcher Teil ein Fab'-, (Fab')₂-, F_v- oder (F_v)₂-Fragment. Als besonders günstig hat sich das F_v-Fragment eines Anti-Hämagglutinin-Neuraminidase-Antikörpers erwiesen.

Der Ausdruck "Zell-Oberflächenprotein" umfaßt jegliches Molekül, das auf einer Zelloberfläche vorliegen kann. Ein solches kann z.B. ein Peptid oder Protein sein, das von der Zelle selbst, von einem Virus in der Zelle oder von der Expression einer

in die Zelle eingeführten DNA stammt. Vorzugsweise ist das "Zell-Oberflächenprotein" ein Virusprotein, wie das Hämagglutinin-Neuraminidase-Molekül von NDV, das Hämagglutinin-Molekül von Influenza Virus oder das Hüllprotein von HTLV-I bzw. HIV, ein Wachstumsfaktor-Rezeptor, ein Onkogen-Produkt, wie v-Erb B2, ein Adhäsionsmolekül, ein Antikörper, wie ein gegen Hapten 2-phenyloxazol-5-on gerichteter Antikörper, oder Streptavidin (Avidin) bzw. ein Teil davon. Als besonders günstig hat es sich erwiesen, wenn das Zell-Oberflächenprotein ein Virusprotein von NDV ist, wobei insbesondere das Hämagglutinin-Neuraminidase-Molekül von NDV zu erwähnen ist.

Der Ausdruck "zweite Bindungskomponente" umfaßt jegliche Verbindung, die einerseits an eine erste Bindungskomponente und andererseits an ein kostimulatisch wirkendes Molekül einer Effektorzelle binden kann. Die Bindung kann direkt oder indirekt sein. Vorzugsweise ist die Verbindung ein Antikörper oder ein eine Bindungsdomäne aufweisender Teil davon. Günstigerweise ist ein solcher Teil ein

Fab'-, (Fab')₂-, F_v- oder (F_v)₂-Fragment. Als besonders günstig hat sich das F_v-Fragment eines Anti-CD19-, Anti-CD20-, Anti-CD22- bzw. Anti-CD-28-Antikörpers erwiesen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die vorstehende Verbindung ein B7 Protein oder ein Teil davon (vgl. Nature 366 (1993), 76; Science 262 (1993), 909"). Als besonders günstig hat es sich erwiesen, wenn ein solcher Teil nicht die Membran-gebundene Domäne umfaßt. Des weiteren ist es vorteilhaft, wenn die Verbindung ein Lymphokin, Interferon oder Interleukin ist.

Der Ausdruck "Effektorzelle" umfaßt jegliche an einer Immunreaktion beteiligte Zelle. Vorzugsweise handelt es sich um eine T-Zelle.

Der Ausdruck "kostimulatorisch wirkendes Molekül" umfaßt jedliches Molekül einer Effektorzelle, das durch Bindung oder in sonstiger Weise veranlaßt werden kann, die Effektorzelle zu stimulieren. Ein solches Molekül kann z.B. ein Rezeptor sein. Im Falle einer T-Zelle bieten sich insbesondere die Rezeptoren CD2-, CD3-, CD19-, CD20-, CD22-, CD26-, CD28- und CTLA-4 sowie HSA (Heat Stable Antigen) als günstig für die Erfindung an. Der Rezeptor CD28 ist dabei besonders zu betonen.

10

In einem vorstehenden Bindungsreagens können die beiden Bindungskomponenten direkt oder indirekt miteinander verbunden sein. In letzterem Fall kann dies über einen Komplex, z.B. aus Streptavidin (Avidin) und Biotin bzw. S-Protein und S-Peptid der pankreatischen Ribonuklease A bewirkt werden. Hierzu weist eine der beiden Bindungskomponenten Streptavidin (Avidin) bzw. S-Protein oder einen Teil davon und die andere Bindungskomponente Biotin bzw. S-Peptid oder einen Teil davon auf. Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, die Bestandteile der einzelnen Komplexe an die Bindungskomponenten zu koppeln und diese zur Ausbildung der Komplexe miteinander umzusetzen. Bindungsreagentien, in denen die Bindungskomponenten indirekt miteinander verbunden sind, werden bevorzugt.

15

Weiterhin werden Bindungsreagentien bevorzugt, in denen eine oder beide Bindungskomponenten Gruppen enthalten, die sich zur Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken, d.h. von Disulfidbrücken zwischen Bindungskomponenten verschiedener Bindungsreagentien, eignen. Damit können z.B. Bindungsreagentien, die unterschiedliche, kostimulatorisch wirkende Moleküle binden, gekoppelt an ein einzelnes Zell-Oberflächenprotein gebunden werden. Dies erweist sich in vielen Fällen als besonders günstig, die Immunogenität von Zellen zu steigern.

20

25

Vorstehende Bindungsreagentien können nach üblichen Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, das folgende Schritte umfaßt:

(a) Insertion einer eine erste Bindungskomponente codierenden DNA in einen Expressionsvektor, Expression der DNA, Isolierung des Expressionsprodukts und seine Reinigung,

5 (b) Insertion einer eine zweite Bindungskomponente codierenden DNA in einen Expressionsvektor, Expression der DNA, Isolierung des Expressionsprodukts und seine Reinigung,

10 (c) Kopplung des Expressionsprodukts von (a) mit jenem von (b) in üblicher Weise.

In den Verfahrensschritten (a) und (b) werden eine erste Bindungskomponente bzw. eine zweite Bindungskomponente durch übliche DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Dem Fachmann sind Systeme bekannt, die zur Expression der einzelnen Bindungskomponenten verwendet werden können. Er kennt Vektoren, Expressions-Kontrollelemente und Zellen, die hierfür herangezogen werden können. Als günstig hat es sich erwiesen, beide Bindungskomponenten als F_v -Fragmente von Antikörpern bereitzustellen. Beispielhaft wird auf die Herstellung des F_v -Fragments eines Anti-Hämagglutinin-Neuraminidase-Antikörpers und des F_v -Fragments eines Anti-CD28-Antikörpers hingewiesen. Hierzu werden die Expressionsplasmide pOPE51- α HN bzw. pOPE51- α CD28 konstruiert (vgl. nachstehendes Beispiel 1).

25 Die Expressionsplasmide pOPE51- α HN und pOPE51- α CD28 gehören zur vorliegenden Erfindung.

Desweiteren sind dem Fachmann Verfahren bekannt, die erhaltenen Bindungskomponenten zu reinigen. Beispielhaft wird auf die Reinigung des F_v - α HN-Fragments und des F_v - α CD28-Fragments in nachstehendem Beispiel 2 verwiesen.

30 Im Verfahrensschritt (c) wird die Bindungskomponente von (a) mit jener von (b) gekoppelt. Dem Fachmann sind hierfür verwendbare Verfahren bekannt. Er kennt solche zur direkten wie auch indirekten Kopplung, z.B. über einen Streptavidin

(Avidin)/Biotin- oder S-Protein/S-Peptid-Komplex. Beispielhaft wird auf die Koppung des F_v - α HN-Fragments mit dem F_v - α CD28-Fragment in nachstehendem Beispiel 3 verwiesen.

5 Ein weiteres Verfahren hat sich als günstig erwiesen, um ein vorstehendes Bindungsreagens, z.B. eines, dessen Bindungskomponenten F_v -Fragmente unterschiedlicher Spezifitäten (Spezifität A; Spezifität B) sind, herzustellen. In diesem Verfahren werden die F_v -Fragmente durch Kombination ihrer jeweiligen, z.T. einzeln exprimierten V_H - und V_L -Domänen hergestellt. Hierzu werden in die Domänen Gruppen, die sich zur Ausbildung von Disulfidbrücken eignen, z.B. Cysteine, derart eingeführt, daß überwiegend V_H - und V_L -Domänen einer Spezifität miteinander kombinieren.

10

15 Im einzelnen werden zwei miteinander kompatible Expressionsplasmide verwendet, mit denen gleichzeitig in einem Wirt, z.B. E.coli, folgende Konstrukte exprimiert werden können:

20 (a) eine V_H -Domäne eines Antikörpers der Spezifität A, verbunden über einen Peptid-Linker von z.B. 18 Aminosäuren mit der V_L -Domäne eines Antikörpers der Spezifität B;

25 (b) eine freie V_H -Domäne eines Antikörpers der Spezifität B; und

(c) eine freie V_L -Domäne eines Antikörpers der Spezifität A.

30 Es werden Kombinationen aus V_H - und V_L -Domänen erhalten. Durch die Ausbildung von Disulfidbrücken sind dies überwiegend Kombinationen der Domäne V_H und V_L der Spezifität A und solche der Domäne V_H und V_L der Spezifität B (vgl. Fig. 3).

35 Erfindungsgemäß wird auch eine Vakzine mit inaktivierten Zellen bereitgestellt, die sich dadurch auszeichnet, daß ein oder mehrere Bindungsreagentien an ein Zell-Oberflächenprotein gebunden sind. Eine solche Vakzine weist vorzugsweise

Tumorzellen auf. Diese können aus durch Operation entfernten Tumoren oder aus einer etablierten Zelllinie stammen.

Die (Tumor)Zellen können Virus-modifiziert sein. Auch können durch Virus erhaltene Lysate von (Tumor)Zellen vorliegen. Vorteilhafterweise wird NDV aus Virus verwendet. Als günstig hat es sich erwiesen, wenn das oder die Bindungsreagentien gegen ein Virusprotein von NDV, insbesondere dem Hämagglutinin-Neuramindase-Molekül, gerichtet sind. Beispielhaft wird auf die Herstellung der Tumorvakzine von nachstehendem Beispiel 4 verwiesen.

10

Die (Tumor)Zellen können auch durch Expression einer in sie eingeführten, z.B. für Streptavidin (Avidin) oder einen Antikörper, wie einen gegen das Hapten 2-phenyloxazol-5-on gerichteten Antikörper, codierenden DNA modifiziert sein. Als günstig hat sich erwiesen, wenn bei Streptavidin (Avidin) das oder die Bindungsreagentien biotinyliert sind, während bei dem Antikörper diese das Hapten 2-phenyloxazol-5-on enthalten.

Mit den erfindungsgemäßen, an (Tumor)Zellen anzubringenden Bindungsreagentien ist es möglich, Signale auf kostimulatorisch wirkende Moleküle, z.B. Rezeptoren, von Effektorzellen zu übertragen. Somit empfangen Effektorzellen nicht nur das durch ein Antigen von (Tumor)Zellen vermittelte Signal, sondern werden ferner kostimuliert. Die erfindungsgemäßen Bindungsreagentien eignen sich daher bestens, die Immunogenität von Zellen, insbesondere Tumorzellen, zu steigern. Sie stellen eine große Verbesserung für die aktive Immunisierung dar.

25

Kurze Beschreibung der Zeichnung:

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmids pOPE51- α HN.

30 Ap^R: Ampicillinresistenz-kodierendes Gen; bp: Basenpaare, c-myc: Sequenz, die für ein Epitop codiert, das durch mAk 9E10 erkannt wird; Cys: Nukleotide, die für einen einzelnen Cysteinrest codieren; (His)₅: Sequenz, die für fünf C-terminale

5 Histidinreste codiert; IG: "intergenic" Region des Phagens f1, leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase (pelB leader); linker: Sequenz, die für (Gly₄Ser)₃ codiert, die V_H und V_L verbindet; ori: Startpunkt der DNA-Replikation für CoLE1; P/O: lac Operon Promotor/Operator; V_H und V_L: variable Region der schweren bzw. leichten Kette des Anti-HN-Antikörpers.

Fig. 2 zeigt eine schematische Darstellung des Expressionsplasmids pOPE51- α CD28.

10 Ap^R: Für das Ampicillinresistenz-codierendes Gen; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, die für ein Epitop codiert, das durch mAk 9E10 erkannt wird; Cys: Nukleotide, die für einen einzelnen Cysteinrest codieren; (His)₅: Sequenz, die für fünf C-terminale Histidinreste kodiert; IG: "intergenic" Region des Phagens f1; leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase (pelB leader); linker: Sequenz, die für (Gly₄Ser)₃ codiert, die V_H und V_L verbindet; ori: Standpunkt der DNA-Replication für CoLE1; P/O, lac Operon Promotor/Operator; V und V_L: variable Region der schweren bzw. leichten Kette des Anti- α CD28-Antikörpers.

15 20 Fig. 3 zeigt eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Bindungsreagens.

anti HN: anti-HN-Antikörper; anti CD28: anti-CD28-Antikörper; S=S: Disulfidbrücke.

25 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

**Beispiel 1: Konstruktion der Expressionsplasmide
pOPE51- α HN und pOPE51- α CD28**

(A) Konstruktion von pOPE51- α HN

5

Als Ausgangsmaterial wurde der Vektor pOPE40 verwendet (vgl. Dübel et al., Gene 128 (1993), 97). Dieser enthält eine DNA, die für das F_v -Fragment ($V_H + V_L$) eines Anti-Lysozym-Antikörpers codiert. Die DNA für V_H ist mit jener für V_L über einen Linker verbunden. Der DNA vorstehenden Fragments schließt sich in 3'-Richtung eine DNA an, die für ein Epitop des monoklonalen Antikörpers 9E10 auf dem myc Genprodukt codiert.

10

Zur Herstellung von pOPE51- α HN wurde am 3'Ende vorstehender myc DNA von pOPE40 die DNA-Sequenz TGC ATA CAT CAC CAT CAT eingefügt. Mit

15

dieser für die Aminosäure-Sequenz Cys Ile His His His His codierenden DNA wurde das Codon für die Aminosäure Asn am 3'-Ende der myc DNA ersetzt. Ferner wurden im Linker zwischen V_H und V_L die Restriktionsstellen BssHII und EcoRI entfernt. Darüber hinaus wurden in den Vektoranteil drei Restriktionsstellen, nämlich Ncol(nt. 76-81), MnlI (nt. 579-584) und NotI (nt. 910-917), eingefügt. Es

20

In diesem Expressionsplasmid wurde schließlich die DNA vorstehenden F_v -Fragments (V_H :PvuII-HindIII-Fragment; V_L :EcoRV-BamHI-Fragment) durch jene für das

25

30

(B) Konstruktion von pOPE51- α CD28

Die Konstruktion von pOPE51- α CD28 wurde ausgehend von pOPE51- α Lys, wie unter (A) für pOPE51- α HN beschrieben, durchgeführt. Die DNA, welche für das F_v -

5 Fragment ($V_H + V_L$) eines Anti-CD28-Antikörpers codiert, wurde aus der cDNA einer Hybridomzelllinie mittels üblicher PCR-Technik erhalten (vgl. van Lier, R. et al. in Leucocyte Typing IV, Oxford University Press (1989), 353). Die DNA dieses Fragments wird nachstehend mit F_v - α CD28-DNA bezeichnet.

10 Das erhaltene Expressionsplasmid pOPE51- α CD28 ist in Fig. 2 gezeigt.

Beispiel 2: Expression der F_v - α HN- und F_v - α CD28-DNA sowie Reinigung der Expressionsprodukte (F_v - α HN- und F_v - α CD28-Fragmente)

15 (A) **Expression der F_v - α HN-DNA und Reinigung des Expressionsprodukts (F_v - α HN-Fragment)**

E.coli JM109-Zellen wurden in üblicher Weise mit dem Expressionsplasmid

20 pOPE51- α HN transformiert und in 2 l LB-Medium bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,7 kultiviert. Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG) wurde bis zu einer Endkonzentration von 20 μ m zugegeben. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur 3 h inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (4 500 g, 4°C, 15 min) gesammelt. Die Zellen wurden in 1/50 des ursprünglichen Volumens in 0,1 M Natriumacetat, pH

25 5,5, 10 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) bei 0° suspendiert. Lysozym wurde bis zu einer Endkonzentration von 1mg/ml zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis unter schwachem Schütteln wurden lösliche Zellplasmaproteine durch Zentrifugation (30 000 g, 4°C, 30 min) entfernt. Die Zellpellets wurden in 1/40 des ursprünglichen Volumens in 30 mM Natriumphosphat,

30 0,3 M NaCl, 1mM PMSF, pH 7,0 resuspendiert und durch Beschallung lysiert. Anschließend wurde zentrifugiert (30 000 g, 30 min, 4°C), wodurch lösliche Cytoplasmaproteine entfernt wurden. Die Pellets wurden in dem gleichen Volumen

in 3 M Harnstoff, 25mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,0 suspendiert und die löslichen Proteine durch Zentrifugation, wie vorstehend beschrieben, entfernt. Einschlußkörper wurden in 1/40 des ursprünglichen Volumens in 6 M GuHCl, 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,0 resuspendiert. Das Gemisch wurde erneut zentrifugiert (30 000 g, 30 min, 4°C) und der Überstand gegen 6 M Harnstoff, 25 mM Tris-HCl, pH 7,0 dialysiert. Imidazol wurde bis zu einer Endkonzentration von 30 mM zugegeben. Die Proteinlösung wurde auf eine Chelating Sepharose Fast Flow-Säule gegeben, die mit NiCl_2 beladen und mit 6 M Harnstoff, 25 mM Tris-HCl und 50 mM Imidazol, pH 7,0 äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit dem 5-fachen Säulenvolumen an 6 M Harnstoff, 25 mM Tris-HCl, 50 mM Imidazol, pH 7,0 gewaschen. Gebundene F_v - α HN-Fragmente wurden mit dem 1,5-fachen Säulenvolumen an 6 M Harnstoff, 25 mM Tris-HCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0 eluiert. Anschließend wurde eine IMAC bei Raumtemperatur durchgeführt. Das eluierte Protein wurde bei 4°C gegen 0,4 M L-Arginin-HCl, 0,1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7,0 dialysiert, anschließend unter Verwendung permeabler Collodion-Beutel (Rückhaltevermögen: 12,4 kDa) konzentriert und dann auf eine Superdex 75 HL26/60-Säule aufgetragen, die mit 0,4 M L-Arginin-HCl, 0,1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7,0 äquilibriert worden war. Eine Größenausschlußchromatographie wurde unter Bedingungen, wie von Kurucz et al., PNAS USA, 90 (1993), 3830 beschrieben, durchgeführt. Zur Kalibrierung der Säule wurde ein Gelfiltrationskalibrierungskit aus Ribonuklease A (13,7 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Rinderserumalbumin (67 kDa) verwendet. Die eluierten Fraktionen mit dem F_v - α HN-Fragment wurden gesammelt und gegen PBS (15 mM Natriumphosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,0) dialysiert. Die Proteinkonzentrationen wurden in üblicher Weise bestimmt.

**(B) Expression der F_v - α CD28-DNA und Reinigung des Expressionsprodukts
(F_v - α CD28-Fragment)**

Die Expression der F_v - α CD28-DNA und die Reinigung des F_v - α CD28-Fragments erfolgten, wie unter (A) für F_v - α HN-DNA (Fragment) beschrieben.

Beispiel 3: Kopplung des F_v-αHN-Fragments mit dem F_v-αCD28-Fragment

5 10 mg des F_v-αHN-Fragments (1 mg/ml) von Beispiel 2(A) wurden mit einem 100-fachen Überschuß der bifunktionellen Sulphydryl-Verbindung Bismaleimidohexan (BMH; 1 mM) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden Reste der Sulphydryl-Verbindung durch Dialyse gegen PBS entfernt. Danach wurde das F_v-αCD28-Fragment von Beispiel 2 (B) in äquimolarer Menge zugegeben. Das
10 Gemisch wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch das erfindungsgemäße Bindungsreagens F_v-αHN/F_v-αCD28 erhalten wurde.

Beispiel 4: Herstellung einer Tumorvakzine

15 Von frisch operiertem Tumorgewebe wurden Fett und Bindegewebe in üblicher Weise entfernt. Das Tumorgewebe wurde in kleine Stücke geschnitten und mit 40 ml eines Enzym-Cocktails (Collagenase 0,32 mg/ml, DN-ase 0,535 mg/ml und Hyaluronidase 0,535 mg/ml in HBSS) 1 h bei 37°C unter Rühren inkubiert. Die
20 erhaltene Zellsuspension wurde über ein gebräuchliches Nylon-Netz abgegossen. Bei "sehr harten" Tumoren wurden Gewebereste ein zweitesmal mit vorstehendem Enzym-Cocktail (40 ml) inkubiert und filtriert. Alle Suspensionen wurden vereinigt, mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt und 15 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml vorstehender DN-ase-Lösung
25 resuspendiert und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde auf 50 ml HBSS aufgefüllt und 10 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml HBSS resuspendiert und die Zellen wurden in einer Neubauer-Zellkammer mit Trypan-Blau gezählt.
30 Bei Vorliegen von mehr als 6x10⁷ lebenden Tumorzellen und einem Anteil von Nicht-Tumorzellen (Lymphozyten und Monozyten) von mehr als 50 % der Gesamtzellen wurde ein weiterer Separationsschritt zur Entfernung der Lymphozyten und

Monozyten durchgeführt. Je 100 μ l Dynabeads Anti-CD2 (Pan-T), Anti-CD19 (Pan-B) und Anti-CD14 (Pan-Monozyten) wurden in Röhrchen gegeben und dreimal mit je 7 ml gekühltem HBSS/HSA gewaschen. Diesen Röhrchen wurden in 2 ml kaltem HBSS/HSA resuspendierte Zellen zugegeben und die Röhrchen wurden 30 min auf

5 Eis inkubiert. Magnetbeads wurden mit einem Magnet entfernt und die Zellsuspension wurde abgesaugt, in Röhrchen mit 50 ml HBSS aufgefüllt und 10 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 ml HBSS resuspendiert und anschließend 10 min bei 1300 U/min zentrifugiert.

10 Das erhaltene Zellpellet wurde in HBSS resuspendiert, wobei 1x 10⁷ Zellen in 0,5 ml HBSS aufgenommen wurden. Von der erhaltenen Zellsuspension wurden ca. 0,5 ml in vorbereitete Einfrierröhrchen gegeben. Diesen wurden ca. 0,5 ml Zwei-fach-Einfriermedium auf Eis zugegeben, bevor die Einfrierröhrchen bei -70°C über Nacht gelagert und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden.

15 50 μ l vorstehender, nicht mit Einfriermedium versehener Zellsuspension wurden für Cytospin-Präparate auf Eis gestellt und mit PBS in einer Verdünnungsreihe jeweils 1:1 verdünnt. 6 Eppendorf-Hütchen mit je 50 μ l PBS/BSA wurden jeweils 50 μ l vorstehender Verdünnungsreihe zugegeben und die Hütchen wurden in eine

20 Cytospin-Apparatur eingeführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1000 U/min wurden die Objektträger 1 min mit 100 % Methanol an der Luft fixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung nach dem bekannten Verfahren von Pappenheim. Dann wurden lichtmikroskopisch die Zellen auf ihren Gehalt an Tumorzellen untersucht. Bei einem Gehalt von weniger als 50 % Tumorzellen wurde vorstehende Zell-

25 suspension nicht als Vakzine verwendet.

Bei einem Gehalt von mehr als 50 % Tumorzellen wurde vorstehende Zellsuspension bei 37°C aufgetaut, in ein Röhrchen überführt und auf 14 ml mit PBS aufgefüllt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 1300 U/min wurde der Überstand

30 verworfen. Das Pellet wurde in 100 μ l PBS resuspendiert, in Einfrierröhrchen überführt und mit 30 ml NDS-Suspension (Konzentration 1000 HAU/ml) versetzt. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C, wobei nach 15 min leicht aufge-

schüttelt wurde. Nach der Inkubation wurde sorgfältig gewaschen, ehe ein Aliquot von Tumorzellen (5×10^6 vitale Tumorzellen) mit ca. 5 μ g Protein des erfindungsgemäßen Bindungsreagens von Beispiel 3 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Danach wurde die Zell-Suspension mit 200 Gy bestrahlt. Die Zell-Suspension

5 wurde bis zur Injektion auf Eis gelagert, dann in eine Spritze aufgezogen und mit einer 0,9x40 ml Kanüle intradermal injiziert.

Patentansprüche

5 1. Bindungsreagens, dadurch gekennzeichnet, daß es eine erste Bindungskomponente für ein Zell-Oberflächenprotein und eine zweite Bindungskomponente für ein kostimulatorisch wirkendes Molekül einer Effektorzelle aufweist.

10 2. Bindungsreagens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Bindungskomponente ein Antikörper oder ein eine Bindungsdomäne aufweisender Teil davon ist.

15 3. Bindungsreagens nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil des Antikörpers ein Fab'-, (Fab')₂-, F_v- oder (F_v)₂-Fragment ist.

20 4. Bindungsreagens nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Zell-Oberflächenprotein ein Virusprotein, ein Wachstumsfaktor-Rezeptor, ein Onkogen-Produkt, ein Adhäsionsmolekül, Streptavidin (Avidin) oder ein Antikörper ist.

25 5. Bindungsreagens nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Virusprotein das Hämagglutinin-Neuraminidase-Molekül des Newcastle Disease Virus ist.

30 6. Bindungsreagens nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper gegen Hapten 2-phenyloxazol-5-on gerichtet ist.

7. Bindungsreagens nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Bindungskomponente ein Antikörper oder ein eine Bindungsdomäne aufweisender Teil davon ist.

30 8. Bindungsreagens nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil

des Antikörpers ein Fab'-, (Fab')₂-, F_v- oder (F_v)₂-Fragment ist.

9. Bindungsreagens nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Bindungskomponente ein B7 Protein oder ein Teil davon ist.
5
10. Bindungsreagens nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil von B7 nicht die Membran-gebundene Domäne umfaßt.
- 10 11. Bindungsreagens nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Effektorzelle eine T-Zelle ist.
12. Bindungsreagens nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das kostimulatorisch wirkende Molekül ein CD2-, CD3-, CD19-, CD20-, CD22-,
15 CD26-, CD28-, oder CTLA-4-Rezeptor oder HSA ist.
13. Bindungsreagens nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponenten über einen Komplex miteinander verbunden sind.
20
14. Bindungsreagens nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex aus Streptavidin (Avidin) und Biotin besteht.
15. Bindungsreagens nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex aus S-Protein und S-Peptid besteht.
25
16. Verfahren zur Herstellung eines Bindungsreagens nach Anspruch 1, umfassend die folgenden Schritte:
30
- (a) Insertion einer eine erste Bindungskomponente codierenden DNA in einen Expressionsvektor, Expression der DNA, Isolierung des Expressionsprodukts und seine Reinigung,

(b) Insertion einer zweiten Bindungskomponente codierenden DNA in einen Expressionsvektor, Expression der DNA, Isolierung des Expressionsprodukts und seine Reinigung, und

5 (c) Kopplung des Expressionsprodukts von (a) mit jenem von (b) in üblicher Weise

17. Expressionsplasmid, dadurch gekennzeichnet, daß es eine zweite Bindungskomponente des Bindungsreagens nach Anspruch 1 codierende DNA in einer Expressionseinheit enthält.

10 18. Expressionsplasmid nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es jenes von Fig. 1 ist.

15 19. Expressionsplasmid, dadurch gekennzeichnet, daß es eine zweite Bindungskomponente des Bindungsreagens nach Anspruch 1 codierende DNA in einer Expressionseinheit enthält.

20 20. Expressionsplasmid nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß es jenes von Fig. 2 ist.

21. Vakzine mit inaktivierten Zellen, wobei an ein Zell-Oberflächenprotein ein oder mehrere Bindungsreagentien nach Anspruch 1 gebunden sind.

25 22. Vakzine nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Tumorzellen sind.

23. Vakzine nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen aus durch Operation entfernten Tumoren stammen.

30 24. Vakzine nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen aus einer etablierten Zelllinie stammen.

25. Vakzine nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Zell-Oberflächenprotein ein Antikörper ist.

26. Vakzine nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper 5 gegen das Hapten 2-phenyloxazol-5-on gerichtet ist.

27. Vakzine nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Virus-modifiziert sind.

10 28. Vakzine nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein Newcastle Disease Virus ist.

29. Vakzine nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß das Zell-Oberflächenprotein das Hämagglutinin-Neuraminidase-Molekül ist.

15

20

25

30

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 7. August 1995 (07.08.95) eingegangen, ursprünglicher Anspruch 1 geändert; ursprüngliche Ansprüche 2 und 3 unverändert; ursprüngliche Ansprüche 4-6 gestrichen; ursprüngliche Ansprüche 7-29 in neue Ansprüche 4-26 umnummiert (3 Seiten)]

1. Bindungsreagens, dadurch gekennzeichnet, daß es eine erste Bindungskomponente für das Hämagglutinin-Neuraminidase-Molekül des Newcastle Disease Virus oder für einen Antikörper, der gegen das Hapten-2-phenyloxazol-5-on gerichtet ist, und eine zweite Bindungskomponente für ein kostimulatisch wirkendes Molekül einer Effektorzelle aufweist.
2. Bindungsreagens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Bindungskomponente ein Antikörper oder ein eine Bindungsdomäne aufweisender Teil davon ist.
3. Bindungsreagens nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil des Antikörpers ein Fab'-, (Fab')₂-, F_v- oder (F_v)₂-Fragment ist.
4. Bindungsreagens nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Bindungskomponente ein Antikörper oder ein eine Bindungsdomäne aufweisender Teil davon ist.
5. Bindungsreagens nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil des Antikörpers ein Fab'-, (Fab')₂-, F_v- oder (F_v)₂-Fragment ist.
6. Bindungsreagens nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Bindungskomponente ein B7 Protein oder ein Teil davon ist.
7. Bindungsreagens nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil von B7 nicht die Membran-gebundene Domäne umfaßt.
8. Bindungsreagens nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Effektorzelle eine T-Zelle ist.
9. Bindungsreagens nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das kosti-

mulatorisch wirkende Molekül ein CD2-, CD3-, CD19-, CD20-, CD22-, CD26-, CD28-, oder CTLA-4-Rezeptor oder HSA ist.

10. Bindungsreagens nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponenten über einen Komplex miteinander verbunden sind.
11. Bindungsreagens nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex aus Streptavidin (Avidin) und Biotin besteht.
12. Bindungsreagens nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex aus S-Protein und S-Peptid besteht.
13. Verfahren zur Herstellung eines Bindungsreagens nach Anspruch 1, umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Insertion einer eine erste Bindungskomponente codierenden DNA in einen Expressionsvektor, Expression der DNA, Isolierung des Expressionsprodukts und seine Reinigung,
 - (b) Insertion einer eine zweite Bindungskomponente codierenden DNA in einen Expressionsvektor, Expression der DNA, Isolierung des Expressionsprodukts und seine Reinigung, und
 - (c) Kopplung des Expressionsprodukts von (a) mit jenem von (b) in üblicher Weise
14. Expressionsplasmid, dadurch gekennzeichnet, daß es eine eine erste Bindungskomponente des Bindungsreagens nach Anspruch 1 codierende DNA in einer Expressionseinheit enthält.
15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es jenes von Fig. 1 ist.

16. Expressionsplasmid, dadurch gekennzeichnet, daß es eine eine zweite Bindungskomponente des Bindungsreagens nach Anspruch 1 codierende DNA in einer Expressionseinheit enthält.
17. Expressionsplasmid nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es jenes von Fig. 2 ist.
18. Vakzine mit inaktivierten Zellen, wobei an ein Zell-Oberflächenprotein ein oder mehrere Bindungsreagentien nach Anspruch 1 gebunden sind.
19. Vakzine nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Tumorzellen sind.
20. Vakzine nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen aus durch Operation entfernten Tumoren stammen.
21. Vakzine nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen aus einer etablierten Zelllinie stammen.
22. Vakzine nach einem der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Zell-Oberflächenprotein ein Antikörper ist.
23. Vakzine nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper gegen Hapten 2-phenyloxazol-5-on gerichtet ist.
24. Vakzine nach einem der Ansprüche 18 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Virus-modifiziert sind.
25. Vakzine nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein Newcastle Disease Virus ist.
26. Vakzine nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Zell-Oberflächenprotein das Hämagglutinin-Neuraminidase-Molekül ist.

IN ARTIKEL 19 GENANNTEN ERKLÄRUNG

Als Stand der Technik werden die folgenden Druckschriften genannt:

D1: Critical Reviews in Immunology, Bd. 12, Nr. 3, 1992, Seiten 101-124

D2: Onkologie, Bd. 16, Nr. 5, 1993, Seiten 290-296

D3: Cancer Research, Bd. 53, Nr. 18, 1993, Seiten 4310-4314

D4: Blood, Bd. 82, Nr. 6, 1993, Seiten 1803-1812

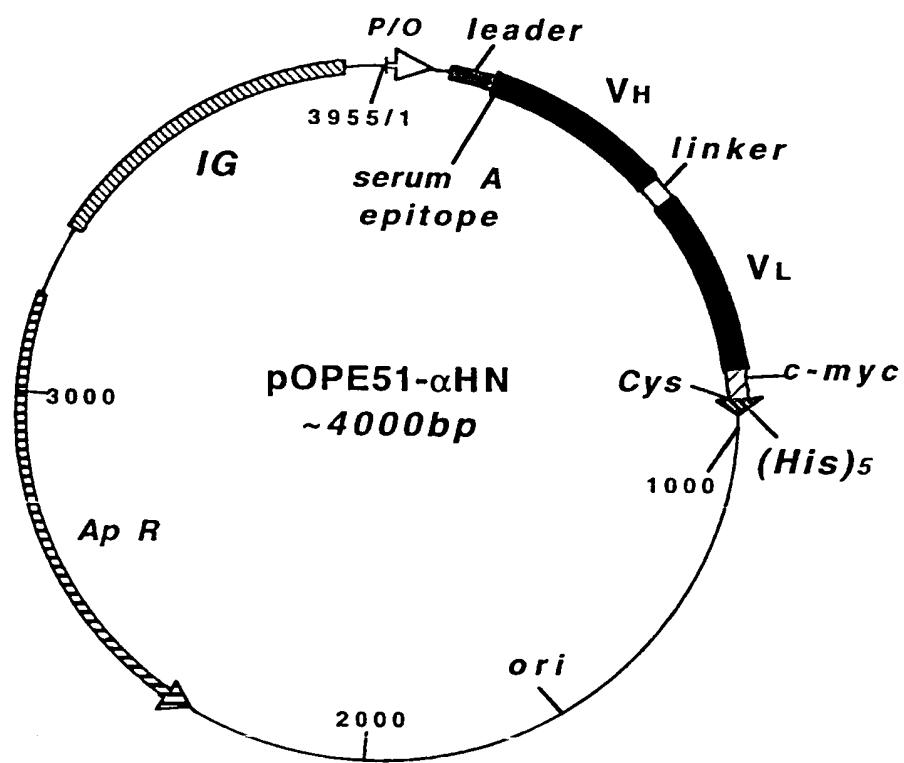
D5: International Journal of Cancer, Bd. 50, Nr. 5, 1992, Seiten 800-804

D6: European Journal of Immunology, Bd. 23, Nr. 10, 1993, Seiten 2592-2596

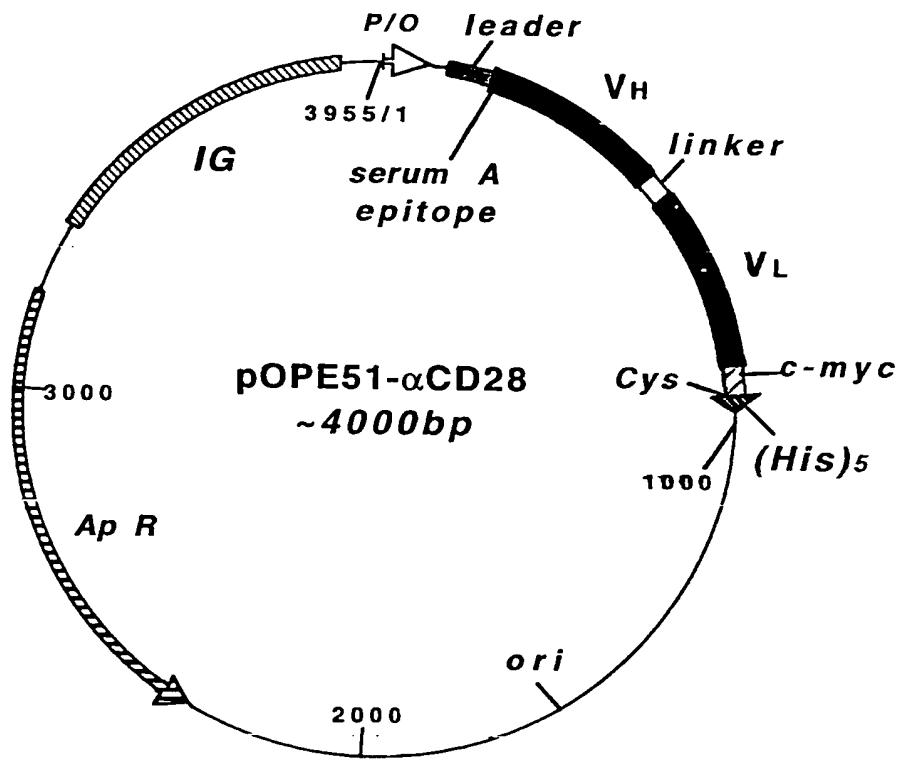
D7: EP-A-0 610 046

Gegenüber dem im Recherchenbericht genannten Stand der Technik sind die Gegenstände der vorliegenden Anmeldung neu und erforderlich.

In keiner der Entgegenhaltungen D1-D8 ist ein Bindungsreagenz, das eine erste Bindungskomponente für das Hämagglutinin-Neuraminidase-Molekül des Newcastle Disease Virus oder für einen Antikörper, der gegen das Hapten 2-phenyloxazol-5-on gerichtet ist, und eine zweite Bindungskomponente für ein kostimulatorisch wirkendes Molekül einer Effektorzelle aufweist, gezeigt bzw. nahegelegt.



Figur 1



Figur 2

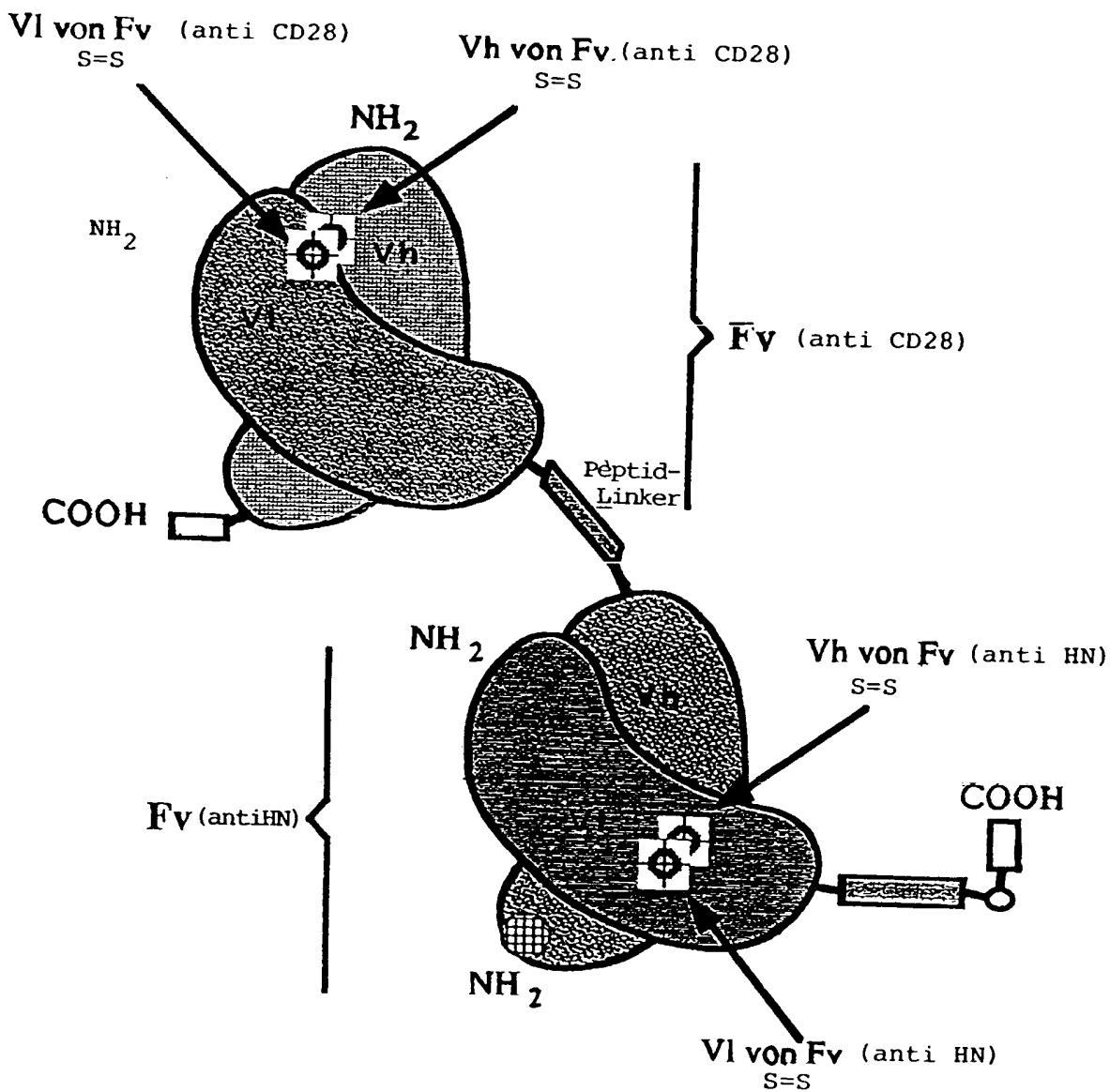


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 95/00843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/70 C07K16/28 C07K16/40 C07K14/705 A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CRITICAL REVIEWS IN IMMUNOLOGY, vol. 12, no. 3, 4, 1992 USA, pages 101-124, M. FANGER ET AL. 'Bispecific antibodies' see page 102, left column, line 43 - right column, line 27 see page 105, right column, line 35 - page 106, left column, line 35 see page 108, right column, line 15 - page 109, right column, line 40 see figures 1,2	1-4, 7-13
Y	----- -/-	5, 21-24, 27-29

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

29 May 1995

Date of mailing of the international search report

06.06.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/EP 95/00843

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ONKOLOGIE, vol. 16, no. 5, October 1993 GERMERING, DEUTSCHLAND, pages 290-296, V. SCHIRRMACHER 'Active specific immunotherapy - A new modality of cancer treatment involving the patient's own immune system.' see the whole document ---	5,21-24, 27-29
X	CANCER RESEARCH, vol. 53, no. 18, 15 September 1993 BALTIMORE, MD, VSA, pages 4310-4314, H. BOHLEN ET AL. 'Cytolysis of leukemic B-cells by T-cells activated via two bispecific antibodies.' see abstract ---	1-3,7,8, 11,12
X	BLOOD, vol. 82, no. 6, 15 September 1993 NEW YORK, NY, VSA, pages 1803-1812, H. BOHLEN ET AL. 'Lysis of malignant B cells from patients with B-chronic lymphocytic leukemia by autologous T cells activated with CD3 x CD19 bispecific antibodies in combination with bivalent CD28 antibodies.' see abstract ---	1-3,7,8, 11,12
X	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 50, no. 5, 12 March 1992 GENF, DIE SCHWEIZ, pages 800-804, T. NISHIMURA ET AL. 'Human c-erbB-2 proto-oncogene product as a target for bispecific-antibody-directed adoptive tumor immunotherapy.' see abstract ---	1-4,7,8, 11-13
A	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 23, no. 10, October 1993 WEINHEIM, DEUTSCHLAND, pages 2592-2596, C. ERTEL ET AL. 'Viral hemagglutinin augments peptide-specific cytotoxic T cell responses.' see the whole document ---	21-24, 27-29
1	P,X EP,A,0 610 046 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 10 August 1994 see examples see claims ---	1-3,7-12 -/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternat'l Application No
PCT/EP 95/00843

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO,A,94 21798 (BRITISH TECHNOLOGY GROUP LTD.) 29 September 1994 see the whole document -----	21-24, 27-29

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/00843

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-610046	10-08-94	CA-A-	2114353	02-08-94
		JP-A-	6319548	22-11-94
WO-A-9421798	29-09-94	AU-B-	6247794	11-10-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internes Aktenzeichen
PCT/EP 95/00843

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/70 C07K16/28 C07K16/40 C07K14/705 A61K39/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräzisierung (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräzisierung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CRITICAL REVIEWS IN IMMUNOLOGY, Bd. 12, Nr. 3, 4, 1992 USA, Seiten 101-124, M. FANGER ET AL. 'Bispecific antibodies' siehe Seite 102, linke Spalte, Zeile 43 - rechte Spalte, Zeile 27 siehe Seite 105, rechte Spalte, Zeile 35 - Seite 106, linke Spalte, Zeile 35 siehe Seite 108, rechte Spalte, Zeile 15 - Seite 109, rechte Spalte, Zeile 40 siehe Abbildungen 1,2	1-4, 7-13
Y	---	5, 21-24, 27-29 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist
- *'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tägigkeit beruhend betrachtet werden
- *'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tägigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 29. Mai 1995	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 06.06.95
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentanlagen 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Nooij, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat	Ics Aktenzeichen
PCT/EP 95/00843	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.	
Y	ONKOLOGIE, Bd. 16, Nr. 5, Oktober 1993 GERMERING, DEUTSCHLAND, Seiten 290-296, V. SCHIRRMACHER 'Active specific immunotherapy - A new modality of cancer treatment involving the patient's own immune system.' siehe das ganze Dokument ---	5, 21-24, 27-29	
X	CANCER RESEARCH, Bd. 53, Nr. 18, 15. September 1993 BALTIMORE, MD, VSA, Seiten 4310-4314, H. BOHLEN ET AL. 'Cytolysis of leukemic B-cells by T-cells activated via two bispecific antibodies.' siehe Zusammenfassung ---	1-3, 7, 8, 11, 12	
X	BLOOD, Bd. 82, Nr. 6, 15. September 1993 NEW YORK, NY, VSA, Seiten 1803-1812, H. BOHLEN ET AL. 'Lysis of malignant B cells from patients with B-chronic lymphocytic leukemia by autologous T cells activated with CD3 x CD19 bispecific antibodies in combination with bivalent CD28 antibodies.' siehe Zusammenfassung ---	1-3, 7, 8, 11, 12	
X	INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, Bd. 50, Nr. 5, 12. März 1992 GENF, DIE SCHWEIZ, Seiten 800-804, T. NISHIMURA ET AL. 'Human c-erbB-2 proto-oncogene product as a target for bispecific-antibody-directed adoptive tumor immunotherapy.' siehe Zusammenfassung ---	1-4, 7, 8, 11-13	
A	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 23, Nr. 10, Oktober 1993 WEINHEIM, DEUTSCHLAND, Seiten 2592-2596, C. ERTEL ET AL. 'Viral hemagglutinin augments peptide-specific cytotoxic T cell responses.' siehe das ganze Dokument ---	21-24, 27-29	
1	P, X	EP, A, O 610 046 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 10. August 1994 siehe Beispiele siehe Ansprüche --- -/-	1-3, 7-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTInternat. des Aktenzeichen
PCT/EP 95/00843

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	WO,A,94 21798 (BRITISH TECHNOLOGY GROUP LTD.) 29.September 1994 siehe das ganze Dokument -----	21-24, 27-29

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. des Aktenzeichen

PCT/EP 95/00843

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-610046	10-08-94	CA-A-	2114353	02-08-94
		JP-A-	6319548	22-11-94
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9421798	29-09-94	AU-B-	6247794	11-10-94
-----	-----	-----	-----	-----